



Rapport du projet GANODIV : 21 Décembre 2009

**Caractérisation moléculaire de la biodiversité fongique et
identification précoce des champignons associés au
phénomène de dépérissement des palmiers à huile, en
particulier *Ganoderma boninense***

Alba Zaremski

Hubert de Franqueville

Frédéric Breton

I. Introduction:

Ganoderma boninense, champignon du sol et agent de la pourriture basale du stipe, dévaste des milliers d'hectares de palmiers à huile en Asie du Sud-est. Il commence à provoquer d'importants dégâts en Afrique centrale et constitue une menace potentielle pour les plantations d'Amérique latine, dont certaines sont déjà atteintes. Le développement de cette menace repose en premier lieu sur le nombre de cycles successifs de culture du palmier à huile sur une même zone.

A ce jour, aucune information n'est disponible sur la diversité et la caractérisation moléculaire de champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile. Ce projet apparaît comme une réponse à ce besoin d'information incontournable sur la biodiversité globale et mondiale de champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile.

Ainsi, il convient de mettre en œuvre la constitution d'une collection de souches de référence de *Ganoderma boninense* basée sur les critères classiques de classification (mise en culture, anatomie, morphologie, etc.) et sur des critères moléculaires (extraction d'ADN, séquençage, phylogénie).

Ce travail consistera à isoler et purifier au laboratoire (culture in vitro sur milieux, en France ou en Indonésie) les champignons responsables des dégradations observées sur le terrain et, également, ceux présents dans le proche environnement (souche forestière, par exemple) ou ceux encore ne provoquant pas de symptômes sur plusieurs années (des palmiers d'aspect sain mais porteurs de carpophores sont repérés en Indonésie).

Ces travaux seront réalisés à partir des champignons en phase active de croissance (carpophore, mycelium). Les souches de cette collection seront maintenues en culture dans les différents laboratoires. La conservation classique par réfrigération, la cryoconservation et la lyophilisation seront évaluées parallèlement par les laboratoires.

II. Etat de l'art et avancement

Des travaux ont montré en 2001 qu'en conditions naturelles de contamination, des différences significatives entre origines génétiques pouvaient être détectées, ce qui a été confirmé en 2005. Dans le même temps, le CIRAD a travaillé sur la mise au point d'un test précoce des sources de résistance et de sensibilité par inoculation artificielle de l'agent pathogène. Grâce à l'étude des nombreux paramètres qui déterminent l'infection, cette mise au point permet désormais de mettre en évidence sur des plantules de trois mois des comportements différents entre isolats du pathogène, d'une part, entre descendances, d'autre part.

Etat de la protection industrielle :

Actuellement le développement du test précoce fait l'objet d'un contrat tripartite Cirad, Socfindo et Lonsum. Le Cirad conserve un droit d'application en dehors de l'Indonésie.

Quelques références bibliographiques

Durand-Gasselin, T., Asmady, H., Flori, A., Jacquemard, J.C., Hayun, Z., Breton, F. & de Franqueville, H., 2005. Possible sources of genetic resistance in oil palm (*Elaeis guineensis*

Jacq.) to basal stem rot caused by *Ganoderma boninense* – prospects for future breeding. *Mycopathologia* 159:93-100.

Miller, R.N.G., Holderness, M., Bridge, P.D., Chung, G.F. & Zakaria, M.H., 1999. Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. *Plant Pathology* 48:595-603.

«In situ molecular detection of some white-rot and brown-rot basidiomycetes infecting temperate and tropical woods». Alba Zaremski, Marc Ducousso, Odile Domergue, Joel Fardoux, Cécile Rangin, Daniel Fouquet, Hélène Joly, Christian Sales, Bernard Dreyfus and Yves Prin. "Canadian Journal of Forest Research": 35:1256-1260 (2005).

Caractérisation moléculaire du M'jej, agent de dépérissement des cédraies du Maroc. Alba Zaremski, Salaheddine Bakkali-Yakhlef, Clémence Chaintreuil, Younes Abbas, Yves Prin, Mohamed Abourouh, Marc Ducousso, Christine Baudasse. Bois et forêts des tropiques n°291 : p. 67-72 (2006).

III. Objectif du projet

Une collection de *Ganoderma boninense*, une fois établie, permettra d'acquérir une meilleure connaissance des principales fonctions impliquées dans le développement, le fonctionnement et l'adaptation à l'environnement des champignons décomposeurs du palmier à huile.

Elle permettra de valider la fiabilité du diagnostic (polymorphisme par exemple lié à l'origine géographique). Elle générera des travaux éclairants et innovants sur l'évolution adaptative des champignons dégradant le stipe du palmier à huile à partir des phylogénies obtenues. Enfin, elle servira à analyser et caractériser « l'agressivité » et « la virulence » des souches.

Ces recherches visent également à l'identification moléculaire d'une espèce fongique sans critère morphologique, c'est-à-dire au premier stade de l'infestation du palmier.

IV. Travaux proposés pour atteindre cet objectif

Les différentes tâches pour constituer cette collection de souches de référence de *Ganoderma boninense* basée sur les critères classiques de classification et sur des critères moléculaires sont les suivantes :

- Prospection et Collecte des champignons sur les différents sites de plantations et dans l'environnement proche.
- Isolement en culture pure, production de mycélium
- Caractérisation morphologique, anatomique, écologique, chimique
- Mise en collection de souches pures des champignons de dépérissement des palmiers à huile
- Mises au point des techniques de caractérisations moléculaires :
- Extraction et purification de l'ADN du champignon à partir de carpophores, de mycélium, de palmier infesté, souches pures, etc...
- Optimisation de l'amplification de l'ADN et du séquençage
- Mise au point et standardisation des méthodes moléculaires
- Construction de la banque de données moléculaires à partir de l'ADN de : carpophores, de mycélium, de palmier infesté, souches pures, etc...
- Analyse des données, constructions d'arbres phylogénétiques, interprétation et établissement de la banque de données moléculaires à partir de l'ADN.

V. Premiers travaux réalisés en 2009

5.1. Matériels et méthodes

5.1.1. Matériel biologique

Le travail a été réalisé à partir de 20 isolats lyophilisés provenant des plantations d'Indonésie. La liste des échantillons avec leur numéro d'identification et l'origine est la suivante (voir avec Frédéric Breton) :

O264, NJ, I10, I13, S2A1, I54, S3C4, I34, S3A3, S2B3, I62, I57, I29, I58, J, GI3, I9, G12, L4, A

5.1.2. Méthodes

Extraction de l'ADN total

Le protocole utilisé pour l'extraction de l'ADN est celui mis en place par Le Quéré *et al.* en 2002, à partir d'une méthode développée par Wöstemeyer en 1985. Ce protocole a été amélioré afin de simplifier les manipulations.

Dans un tube de 10ml, 50 mg de mycélium ont été ajoutés à 1 ml de tampon d'extraction préparé extemporanément et contenant les produits suivants :

- 100 mM de Tris-HCL (pH 8)
- 100 mM d'EDTA
- 2% de SDS
- 1% de β -mercaptoéthanol
- 100 μ g/ml de Proteinase K

L'échantillon est broyé avec un micropilon puis passé au vortex. Il est incubé au bain marie pendant 30 minutes à 55°C puis 1 heure à 37°C. On ajoute 250 μ l de NaCl à 5M, puis 110 μ l de cetyltriméthylammonium (CTAB) à 10% (précipitation des polysaccharides). Le mélange est vortexé puis incubé dans un bain marie à 65°C pendant 10 minutes.

La suspension est transvasée dans un tube Eppendorf à 1.5ml. Ce tube est placé 30 minutes dans la glace puis centrifugé 10 minutes à 6 000 g (élimination des débris cellulaires). Le surnageant est alors transvasé dans un tube froid et 550 μ l d'isopropanol sont ajoutés afin de faire précipiter l'ADN. Le tube est centrifugé à 16 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé. Le culot, contenant l'ADN est lavé, en ajoutant 300 μ l d'éthanol à 70% (élimination des sels). On centrifuge 5 minutes à 13 000 g, on enlève le surnageant. On prendra soin de laisser évaporer toute vapeur d'alcool à l'air libre, sous la hotte.

Le culot ainsi obtenu est dissout dans 50 μ l de TE buffer (1mM EDTA, 10 mM tris-HCl pH 8). La dissolution est facilitée par une incubation pendant une nuit à 4°C.

Révélation des ADN sur gel d'agarose

Les produits d'extraction sont visualisés par électrophorèse sur gel. Cette étape s'effectue à l'aide d'un gel d'agarose à 1% auquel sont ajoutées trois gouttes de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 μ g/ml. Le BET est un agent intercalant qui va nous permettre de visualiser les fragments : il va s'insérer entre les bases de l'ADN et, étant donné qu'il est fluorescent, sous les rayons Ultra Violets, les fragments d'ADN qui auront migré sur le gel deviendront visibles. 5 μ l d'ADN mélangé à du bleu de charge (glycérol 30 % qui alourdit l'ADN, du bleu

de bromophénol 0,25 %, EDTA 10mM, à pH 8) sont déposés dans les puits du gel. La migration est réalisée à 100 Volts pendant une heure. La migration terminée, l'ADN, rendu visible par le BET est révélé sous UV.

Quantification des ADN extraits

Cette étape est réalisée en utilisant le spectrophotomètre Nano Drop ND-100. Il mesure la concentration et la pureté de l'ADN extrait avec 2µl d'échantillon. L'indice de pureté est calculé grâce aux rapports des mesures de l'absorbance à 260 et 280 nm. Ce rapport 260/280 doit se rapprocher de 1,8 pour qualifier l'échantillon de pur. Des valeurs plus petites indiqueraient la présence d'impuretés ou de protéines absorbant aux environs des mêmes longueurs d'ondes.

La PCR : Polymerase Chain Reaction

Les régions analysées

L'ADN ribosomal nucléaire est présent en de multiples copies à l'intérieur du génome comportant à la fois des régions variables et des régions très conservées et la plupart des données existant actuellement concernent cette région de l'ADN. Ainsi ses variations sont relativement bien connues chez de nombreux organismes, y compris certains champignons (Henrion *et al.*, 1992 ; Berbee et Taylor, 1993 ; Cullings et Vogler, 1998).

La région choisie de l'opéron ribosomal de l'ADN nucléaire est la zone comprise entre les amorces ITS1 et ITS4 spécifiques des champignons (Gardes et Bruns, 1993). Cette région comprend le gène codant pour la petite sous-unité ribosomale 5,8S, peu variable ainsi que l'ITS1 et l'ITS2 qui séparent respectivement ce gène du gène 18S et du gène 28S. L'ITS 1 et l'ITS 2 ne sont pas exprimés ; de ce fait, d'éventuelles variations y sont plus probables, ce qui engendre une grande variabilité de ces régions.

Le protocole d'amplification

C'est une réaction qui va nous permettre d'amplifier une partie spécifique de l'ADN et d'en obtenir des millions. Cette méthode est basée sur la répétition de la réplication in vitro de l'ADN et cela grâce à plusieurs éléments mis en présence :

- Les désoxyribonucléotides triphosphates ou dNTPs (ATP, TTP, GTP, CTP), sont les nucléotides à partir desquels l'enzyme va polymériser le brin complémentaire du brin matrice.
- des amorces spécifiques qui sont choisies pour encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Nous travaillons sur des champignons, aussi les amorces utilisées sont spécifiques des champignons :

ITS 1-myc	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGC 3'
ITS 4-myc	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
- une enzyme thermostable : la Taq polymérase, c'est une ADN polymérase utilisée pour la duplication de l'ADN dans la réaction de PCR. Elle a été extraite à partir de bactéries thermophiles (*Thermophilus aquaticus*) vivant dans les geysers du parc de Yellowstone (États-Unis). Elle peut donc résister et rester active à de très hautes températures, ce qui est indispensable à la pratique d'une PCR.

L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel total de 50 µl de la composition suivante :

Composants	Volume (µl)
Eau (qsp 50 µl)	26,7
Tampon	10
dNTP	4
ITS 1	2
ITS 4	2
Taq polymérase	0,3
ADN à amplifier (environ 50 ng/µl)	5

La PCR est une série de cycles thermiques répétés n fois et comportant 3 étapes :

- **La dénaturation** : elle s'effectue par chauffage, au dessus de la température de fusion (T_m) de l'ADN, à 94°C, ce qui permet la rupture des liaisons hydrogènes, qui maintiennent l'ADN double brin, établies entre les bases (3 liaisons entre G-C et 2 entre A-T). On obtient alors une molécule d'ADN double brin prête pour l'hybridation avec les amorces.
- **L'hybridation** : la température est abaissée progressivement vers une température dépendant des températures d'hybridation (T_h) des deux amorces utilisées qui doivent donc être voisines. Cette T_h est inférieure d'environ 5 à 10°C à la température de fusion. Cette dernière dépend de la composition en bases des amorces et est calculée grâce à la formule suivante : $T_m = 2x(A+T) + 4x(G+C)$. On obtient donc T_m (ITS 1) = 64,5 °C et T_m (ITS 4) = 58,4 °C. La température choisie pour cette étape a donc été de 55°C pour permettre l'hybridation des 2 amorces. Dans ces conditions, les amorces vont alors se fixer sur chaque brin, de part et d'autre de la région à amplifier.
- **L'élongation** : la température est remontée pour atteindre la température optimale (72°C) de la Taq polymérase qui va alors synthétiser deux nouveaux brins à partir des amorces en piochant les dNTPs complémentaires du brin matriciel dans le milieu.

A chaque manipulation un témoin négatif et un témoin positif ont été effectués pour vérifier respectivement l'absence de contamination du milieu réactionnel et le contrôle du bon déroulement de la réaction. Les PCR sont effectuées avec un thermocycleur (Perkin Elmer Applied Biosystems : Gene-Amp PCR system 9700 ou 2400) qui change automatiquement de température selon le programme prédéfini.

Analyse des produits de la PCR

Les produits d'amplification sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Dans les puits du gel, 25 µl de produits d'amplification sont déposés. Le tampon utilisé lors de la PCR contient un colorant vert qui nous servira à visualiser le front de migration. De part et d'autre du gel, on ajoute le marqueur de poids moléculaire qui nous permettra de déterminer la taille des bandes obtenues.

La migration s'effectue sous une tension de 100 Volts pendant environ 1 heure dans le tampon d'électrophorèse TAE 1X. Ce tampon TAE (Tris Acétate EDTA), utilisé aussi bien dans la préparation du gel que dans la cuve de migration, impose un pH de 8 au milieu de migration, l'ADN est alors chargé négativement et va migrer vers le pôle positif du gel.

La révélation est faite sous UV. Le logiciel « Perfect Image » est utilisé pour photographier les gels. Les bandes révélées sont alors découpées afin de les purifier par la suite.

Purification des fragments d'ADN sur gel

Les bandes de gel contenant l'ADN sont découpées sous UV au scalpel et chaque bande est mise dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Les fragments d'ADN vont pouvoir être extraits et purifiés à l'aide du kit « Qiaquick Gel extraction » de la société Qiagen.

Séquençage

La concentration d'ADN de l'extrait est quantifiée à l'aide du Nano Drop déjà utilisé dans des manipulations antérieures. Les échantillons sont ensuite envoyés pour le séquençage à la société Macrogen, en Corée du Sud.

Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

Le BLAST, Basic Local Alignment and Search Tool, (Altschul *et al.*, 1997) est une méthode spécialement développée pour confronter une séquence nucléique ou protéique inconnue à l'ensemble de celles que l'on trouve dans les banques nucléiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées par hasard. BLAST détecte de courts segments (onze nucléotides identiques ou deux tripeptides similaires) qui sont localement homologues à la séquence inconnue (Altschul *et al.*, 1997).

Dans notre étude, après avoir obtenu et corrigé les séquences à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel CHROMAS nous effectuerons des BLASTn (Nucléotide) sur internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) pour comparer nos séquences avec celles présentes en banques.

VI. Résultats et discussions

- La concentration et la pureté des ADN totaux extraits ont été évaluées comme décrit dans la partie précédente (*cf.* partie Quantification des ADN extraits de la partie matériels et méthodes). Les quantités d'ADN obtenues varient en fonction des échantillons et la pureté des échantillons n'est pas optimale. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'obtention de culots colorés dus probablement à la présence de pigments, de tanins, de protéines ou d'impuretés qui « fausseraient » les mesures effectuées au Nano Drop. Dans ce dernier cas, une étape supplémentaire concernant le lavage du culot, lors de l'extraction de l'ADN, peut être envisageable. Le Tableau 1 présente la concentration et la pureté des ADN extraits.

Tableau 1 : Résultats d'extraction des souches tropicales lyophilisées

Nom de l'échantillon	Concentration en ADN (ng/μL)	Rapport 260/280
I62	50.31	1.59
I57	367.29	1.57
I9	344.72	1.69
S2A3	226.97	1.55
S2A1	1959	1.67
S3C4	2823	1.53
I10	1935	1.87
I54	1044	1.54
NJ	322.02	1.53
O264	846.07	1.84
I13	849.45	1.54
I34	1253	1.74
S2B3	2036	1.37
A	911.52	1.55
G13	399.44	1.44
I58	943.61	1.63
G12	2002	1.47
I29	1990	1.28
L4	1172	1.36
C	721.69	1.62

- Tous les échantillons ont subi une PCR au 100^{ème}.

La dilution réduit la présence d'éventuelles impuretés inhibant certaines réactions spécifiques de la Taq polymérase (hybridation optimale des amorces ITS1 et ITS4). Cette dilution entraîne donc une spécificité plus élevée de la Taq polymérase, permettant ainsi d'obtenir de meilleurs résultats.

- Les amplifiats obtenus ont été découpés sous UV, purifiés et envoyés au séquençage. Ils ont été tous interprétables.

- Les comparaisons des séquences obtenues par BLASTn des échantillons lyophilisés sont présentées dans le tableau 2.

Dans ce tableau figurent la référence de la souche étudiée, le nombre de paires de bases de la séquence amplifiée (npb), l'identité de la souche après BLASTn (genre et espèce) de la séquence la plus proche avec son numéro d'accès de GENBANK et la longueur de séquence utilisée pour la comparaison par BLAST avec son pourcentage d'identité noté entre parenthèses.

Tableau 2 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné la même espèce et le même genre de champignon pour la séquence la plus proche.

Echantillons	Longueur de l'ITS en nombre paires de bases (npb)	Identité de la souche après BLASTn	Pourcentage de correspondance avec la banque de données internationale
A	199	AY 220542 <i>Ganoderma</i> sp.	113/135 (83%)
I9	205	EU645695 <i>Aspergillus aculeatus</i>	156/191 (81%)
I10	242	EU239386. <i>Ganoderma</i> aff. <i>Steyaertanum</i>	49/57 (85%)
I13	241	EU239386. <i>Ganoderma</i> aff. <i>Steyaertanum</i>	84/107 (78%)
I29	222	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	154/190 (81%)
I34	241	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	134/169 (79%)
I54	239	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	171/227 (75%)
I57	228	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	168/192 (88%)
I58	274	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	161/225 (71%)
I62	245	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	159/198(80%)
GI3	408	GQ169495 <i>Aspergillus</i> sp.	335/345 (97%),
GI2	160	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	111/153 (72%),
S2A1	226	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	93/113 (82%)
S2A3	325	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	225/265 (84%)
S2B3	345	AY569450 <i>Ganoderma cupreum</i>	246/309 (79%)
S3C4	356	FJ478088 <i>Ganoderma fulvellum</i>	246/310 (79%)
O264	238	AM160626 <i>Candida xestobii</i>	154/218 (70%)
L4	425	EU918695 <i>Ganoderma gibbosum</i>	247/310 (79%)
C	641	EF016754 <i>Ganoderma</i> sp.	612/619 (98%)
NJ	378	GQ169495 <i>Aspergillus</i> sp.	225/279 (81%)

Les résultats des BLASTn présentés dans le Tableau 2 ont donné pour chacune des souches bien identifiées au départ selon les critères anatomo-morphologiques un genre et une espèce. Pour 80%, les BLAST des séquences des produits d'amplification des échantillons ont tous révélé le nom du genre du champignon attendu et conforme à notre identification initiale selon les critères morpho-anatomiques pour le genre *Ganoderma*. Les 20% des souches

restantes révèlent des contaminants des genres *Aspergillus* et *Candida* qui appartiennent successivement à la classe des Ascomycètes et des Saccharomycetes. Ce sont des champignons qui ne génèrent en aucun cas la dégradation du palmier à huile. Nous pensons qu'ils se sont développés lors des manipulations de lyophilisation des mycéliums.

L'évaluation du nombre de paires de bases des ITS pour les différents échantillons met en évidence des ITS d'une longueur comprise entre 160 et 641 pb.

VII. Conclusion

Afin de caractériser les souches qui infestent le palmier à huile, nous avons développé une méthode rapide et discriminante basée sur l'analyse de la diversité de séquences partielles d'ADN ribosomique indépendamment au recours aux caractères morphologiques macro- et microscopiques des sporophores nécessaires à l'identification des genres et espèces.

L'adaptation du protocole mis en place au CIRAD, nous a permis d'extraire les ADN de tous nos échantillons à partir de quelques mg de mycélium ; extraits d'ADN qui nous ont permis d'obtenir, avec la plupart des souches étudiées, un amplifiât d'ITS d'une taille variant de 160 à 641 paires de bases.

L'analyse par BLASTn des séquences obtenues du fragment ITS1/ITS4 avec ces 20 souches nous a permis de caractériser ces souches. L'utilisation de ce fragment présente plusieurs avantages notamment la bonne reproductibilité d'obtention des séquences et l'existence d'une importante quantité de séquences en banque de données. La variabilité de ce fragment, en particulier pour les régions ITS1 et 5,8S, est souvent suffisante, mais toujours dépendante de la qualité des séquences de la banque, pour caractériser le niveau taxonomique du genre et de l'espèce de la souche.

Sous réserve de vérification de la base des séquences utilisées pour le BLASTn, cette méthode donne des indications taxinomiques pour des souches ou des mycéliums pour lesquels aucune autre caractéristique n'est disponible.

Cette technique simple rapide est efficace et parfaitement adaptée au suivi de souches dans des essais contrôlés

VIII. Perspectives

Cette étude devra aboutir aux outils suivants :

- de cartographie et de caractérisation de la biodiversité globale et mondiale des champignons responsables des maladies des palmiers à huile,
- d'étude phylogénétique globale afin d'analyser la corrélation entre les données génétiques et les informations disponibles sur l'origine des souches
- d'aide au diagnostic des champignons responsables des maladies des palmiers à huile,
- de quantification et d'évaluation de l'activité de ces champignons,
- de détermination du risque de ré-infestation par le champignon lignivore diagnostiqué en fonction de son état physiologique.
- d'évaluation de la sensibilité aux fongicides autorisés par la législation en utilisant le matériel biologique collecté.